

Изучение фармакодинамики наноразмерной формы феназепама на основе поли (бутил) цианоакрилатных наночастиц

*Балабаньян В. Ю.¹, Разживина В. А.¹, Максименко О. О.², Кондрахин Е. А.³,
Ковалев Г. И.³, Воронина Т. А.³*

¹ — ООО «Технология лекарств», Химки, Московская область

² — ООО «НПК «Наносистема», Москва

³ — ФГБУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» РАМН, Москва

Резюме

Поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы с феназепамом получали методом полимеризации 2-п-бутилцианоакрилата в кислой среде в присутствии стабилизаторов. Размеры наночастиц составили 230–250 нм, степень включения феназепама — 65%. В опытах на экспериментальных животных (крысы, мыши) установлено, что феназепам, включённый в наночастицы, покрытые полисорбатом 80, оказывает выраженное анксиолитическое, антиагрессивное и противосудорожное действие, аналогичное действию феназепама в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции, в терапевтических дозах (0,1–2,0 мг/кг, в/в) не обладает седативным и миорелаксантным действием. Анксиолитическое действие наноразмерной формы феназепама ослабляется флумазенилом и бикикуллином. Изучена возможность прямого влияния наноформы феназепама на связывание [N-метил-³H]-флунизепам мембранами гиппокампа крыс. Установлены количественные параметры рецепторного связывания феназепама, включённого в поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы.

Ключевые слова: феназепам, поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы, рецепторное связывание, апополипротеины плазмы крови, нанофармакология, наноформа, фармакодинамика, анксиолитик

Введение

Феназепам — отечественный анксиолитик из группы производных бензодиазепаина, широко применяющийся в лечебной практике как анксиолитическое, седативное, снотворное и противосудорожное средство уже более 25 лет. Вместе с тем наличие побочных эффектов, выражающихся в ухудшении моторных и мнестических функций, риске возникновения лекарственной зависимости и синдрома отмены, существенно лимитирует применение феназепама в клинической и, особенно, амбулаторной практике. Уменьшить или устранить побочные эффекты феназепама представляется возможным при создании его наноразмерной формы на основе полимерных наночастиц из поли (бутил) цианоакрилата. К настоящему времени можно считать доказанным, что при включении лекарственных веществ (ЛВ) в наночастицы существенно меняется профиль распределения ЛВ, повышается эффективность и продолжительность действия, а также снижаются побочные эффекты и токсичность [1–8].

Экспериментальная часть

Получение поли (бутил) цианоакрилатных наночастиц (ПБЦА НЧ) с феназепамом и определение их физико-химических характеристик

В исследовании использовали мономер бутилцианоакрилата (Sicomet 6000, Sichel-Werke, Hannover, Germany). Наночастицы получали методом кислотной полимеризации в среде, содержащей в качестве стабилизатора декстран (мм 70 кДа) в 0,1М растворе соляной кислоты. К раствору феназепама (76,7 мг) в хлористом метиле (2,27 г) добавили 180 мкл бутилцианоакрилата. Для достижения полного растворения бутилцианоакрилата использовали перемешиватель Vortex (VWR International, Германия) и ультразвуковую баню. Полученный раствор количественно переносили в водную фазу (36,8 мг безводной лимонной кислоты; 2,35 г полоксамера 188; 20,65 мл воды) и подвергали ультразвуковой гомогенизации на гомогенизаторе (Ultra-Turrax T18 basic, Германия) в течение 1 минуты. Суспензию перемешивали на магнитной

мешалке (Labtex Daihan, Корея) в течение 3 часов для удаления органического растворителя и полимеризации мономера, после чего фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» и лиофилизировали (лиофильная сушка Alpha 2–4 LSC Christ, Германия). В качестве криопротектора использовали маннит. Размер частиц определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии (наносайзер Nanosizer NanoZS, Malvern Instruments, Великобритания). Содержание феназепама в наночастицах определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Helios Zeta UV–VIS, Thermo Scientific, США). Перед введением животным лиофильно высушенные наночастицы ресуспендировали в 0,9% растворе натрия хлорида, а затем инкубировали в течение часа с 1% раствором полисорбата 80 (ПС 80).

Изучение фармакологических эффектов феназепама, включённого в ПБЦА НЧ

Опыты проведены на самцах белых нелинейных крыс массой 250–280 г и самцах белых беспородных мышей массой 23–28 г. (питомник «Столбовая» РАМН). Животных содержали в виварии в стандартных клетках при температуре 18–20 °C при свободном доступе к пище и воде.

Анксиолитическое действие веществ изучали в тесте приподнятого крестообразного лабиринта [9]. Методика приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) основана на естественной боязни открытого пространства, новизне обстановки и страха падения с высоты [10]. Мышь помещали на центральную площадку лабиринта и в течение 3-х мин регистрировали: число выходов и длительность пребывания в открытых рукавах, число свешиваний с открытых рукавов и выходов в закрытые рукава.

Антиагрессивное действие феназепама исследовали в тесте «драки» животных [9]. Мышей парами высаживали на электродный пол и раздражали постепенно увеличивающимся по силе прерывистым электротоком до возникновения драки. Регистрировали напряжение тока, при котором у животных возникала драка.

Седативное действие оценивали с помощью метода «открытого поля» в опытах на крысах и мышах. Регистрировали в течение 3-х мин число пересечённых квадратов, вертикальных стоек и обследованных отверстий.

Миорелаксантное действие веществ изучали с помощью метода вращающегося стержня (rota rod) со скоростью вращения 3 об/мин в эксперименте на крысах и мышах.

Противосудорожное действие оценивали в двух тестах. В тесте антагонизма с коразолом изучали способность феназепама предупреждать тонико-

клонический компонент судорожного припадка у крыс, вызванного коразолом (70 мг/кг, п/к). Влияние веществ на первично-генерализованную эпилептиформную активность по показателям ЭЭГ оценивали в течение 30-ти минут после введения бемегида (10 мг/кг в/нб). Регистрировали длительность судорожных разрядов и число разрядов за минуту [9].

Изучение влияния флумазенила и бикикуллина на анксиолитический эффект феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы

Исследования проводили в опытах на крысах в тесте конфликтной ситуации. Феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, вводили группе животных внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг. Затем, с 15-минутным интервалом этим же крысам вводили флумазенил (внутрибрюшинно в дозе 10 мг/кг) и через 15 минут оценивали анксиолитическое действие, регистрируя количество наказуемых взятий воды. Феназепам, включённый в матрикс ПБЦА наночастиц, вводили группе животных (внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг), затем сразу же вводили бикикуллин (внутрибрюшинно в дозе 1 мг/кг). Через 30 минут оценивали различие анксиолитического действия между этой группой животных и контрольными группами.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с помощью компьютерной программы BioStat for Windows. Достоверность различий оценивали с помощью вышеуказанной программы с использованием критериев Стьюдента и Фишера (при $p \leq 0,05$).

Изучение рецепторного связывания феназепама, включённого в ПБЦА НЧ с бензодиазепиновыми рецепторами (БДЗ-рецепторы) мозга в условиях in vitro и ex vivo

Приготовление мембран. Исследуемых животных декапитировали, извлекали головной мозг, отделяли гиппокамп, гомогенизировали в 16 мл ледяного (0–4 °C) 50 mM Tris-HCl буфера (pH 7,4) используя гомогенизатор тефлон-стекло. Полученную суспензию центрифугировали при 42 000 g в течение 25 мин в ультрацентрифуге Optima L-70K (Beckman Coulter). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объёме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 20 мл Tris-HCl буфера и использовали по 250 мкл в процедуре связывания [N-метил-³H]-флунитразепама.

Процедура радиолигандного связывания. Полученную мембранную фракцию головного мозга

инкубировали с [N-метил- ^3H] -флунитразепамом (удельная активность 81 Ки/ммоль) в течение 30 мин при температуре 0–4 °С. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого феназепама (20 мкМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Процесс связывания останавливали путём добавления ледяного буфера и быстрой фильтрацией через стекловолоконные фильтры типа GF/B (Whatman) с последующей двукратной промывкой ледяным буфером общим объёмом 8 мл.

Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия. Фильтры высушивали в течение 12 часов при комнатной температуре, затем помещали в сцинтилляционную жидкость (реактив Брея) объёмом 5 мл и использовали для сцинтилляционного счёта. Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на сцинтилляционном счётчике PerkinElmer 2900TR. Эффективность счёта составляла более 45%. Неспецифическое связывание составляло не более 10% от общего.

Анализ радиорецепторного связывания. Для обработки результатов радиолигандного связывания и построения кривых связывания радиоактивного лиганда использовали программу *Graphpad Prism 4 Demo*. При анализе насыщения и получения характеристик связывания B_{max} (величина отражает количество мест связывания лиганда на соответствующих рецепторах в исследуемой структуре мозга) и K_d (отражает аффинитет лиганда к местам связывания на рецепторном комплексе) измеряли специфическое связывание в диапазоне концентраций меченого лиганда от 0.01 до 20 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Неспецифическое связывание определяли в присутствии немеченого лиганда (20 мкМ). Для построения кривых вытеснения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 3-х повторностях. Результаты представлены в виде «mean±S.E.M».

Результаты исследования

Получение ПБЦА НЧ с феназепамом. Наночастицы были приготовлены методом кислотной полимеризации в среде, содержащей

декстран 70000 в качестве стабилизатора. Показано, что оптимальная скорость перемешивания при полимеризации — 500 об/мин, оптимальным стабилизатором является декстран-70 в диапазоне концентраций от 0,5 до 2,5%. Выявлена зависимость между уровнем pH полимеризационной среды и размерами ПБЦА НЧ — размер ПБЦА НЧ увеличивается при снижении pH от 3 до 1,9. Показано, что наносуспензия с феназепамом остаётся стабильной в течение 24 часов.

Методом фотонной корреляционной спектроскопии установлено, что размеры ПБЦА НЧ с феназепамом лежат в пределах от 230 до 250 нм. Включение феназепама в НЧ составило 65%.

Изучение фармакологических эффектов феназепама, включённого в ПБЦА НЧ, в сравнении с феназепамом в субстанции. Анксиолитическое действие было изучено в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) в опытах на мышах. Установлено, что феназепам в субстанции оказывал отчётливый дозозависимый анксиолитический эффект (табл. 1). В дозе 0,1 мг/кг он увеличивал время, проведённое в открытых рукавах в 6,3 раза, в дозе 0,5 мг/кг — в 7,9 раза и в дозе 1,0 мг/кг — в 11,2 раза (рис. 1).

НаноФен также оказывал выраженный, зависимый от дозы анксиолитический эффект (табл. 1). В дозе 0,1 мг/кг (внб) он увеличивал время, проведённое в открытых рукавах в 7,6 раза, в дозе 0,5 мг/кг — в 10,9 раза и в дозе 1,0 мг/кг — в 13,7 раза (рис. 1).

Таким образом, по выраженности анксиолитического эффекта НаноФен даже несколько превос-

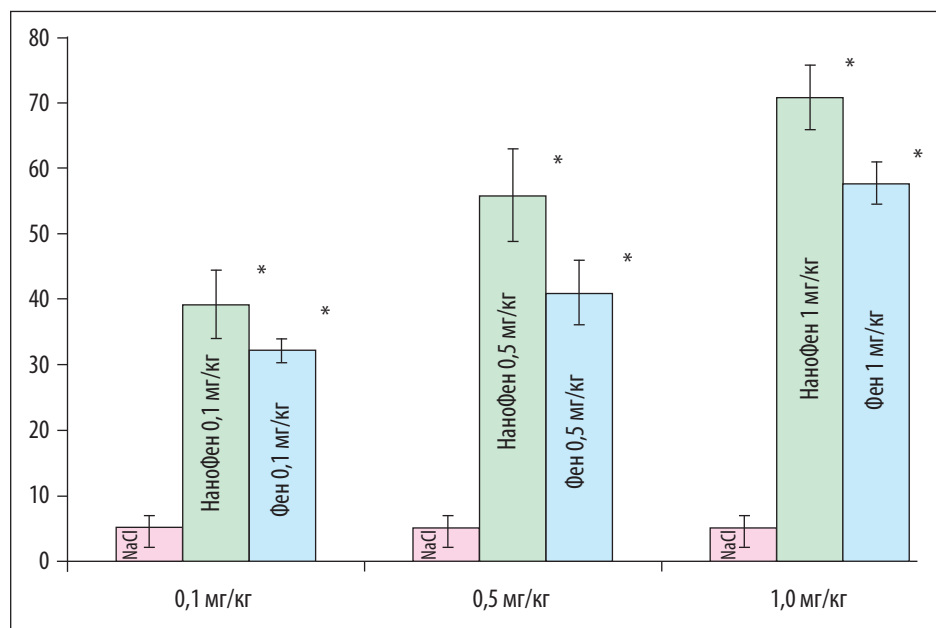


Рис. 1. Анксиолитическое действие феназепама, включенного в матрикс ПБЦА наночастиц (НаноФен), в сравнении с феназепамом в субстанции в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах

* — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

Таблица 1

Анксиолитическое действие феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы (НаноФен), в сравнении с феназепамом в субстанции (Фен-Субс), в тесте приподнятого крестообразного лабиринта на мышах

Вводимые вещества	Число выходов в открытые рукава	Время в открытых рукавах (сек.)	Число свешиваний	Число выходов в закрытые рукава
Контроль (NaCl)	0,43±0,09	5,14±1,78	0,29±0,12	2,29±0,1
НаноФен (0,1 мг/кг, вnb)	2,53±0,16*	39,16±5,18*	2,11±0,24*	1,1±0,09*
Фен-Субс (0,1 мг/кг, вnb)	3,27±0,48*	32,3±3,16*	2,66±0,61*	0,64±0,18*
НаноФен (0,5 мг/кг, вnb)	2,73±0,18*	55,86±7,14*	2,12±0,47*	1,3±0,22*
Фен-Субс (0,5 мг/кг, вnb)	2,57±0,48*	41,1±5,17*	2,06±0,52*	1,1±0,21*
НаноФен (1 мг/кг, вnb)	2,57±0,89*	70,86±4,84*	2,29±0,52*	1,28±0,41*
Фен-Субс (1 мг/кг, вnb)	2,43±0,75*	57,8±6,77*	1,86±0,41*	1,28±0,41*

Примечание: * — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

ходит феназепам в субстанции, однако, различия не носят достоверного характера.

Антиагрессивное действие было изучено в тесте немотивированной агрессивности — «драки» на электродном полу в опытах на мышах. При использовании феназепама в субстанции в дозе 2 мг/кг порог болевой реакции животных увеличился в 1,9 раз, а порог агрессивной реакции — в 1,6 раз (табл. 2).

Таблица 2

Антиагрессивное действие феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы (НаноФен) и феназепама в субстанции (Фен-Субс) в тесте «драки» у мышей

Показатели поведения	Контроль (NaCl)	НаноФен (2 мг/кг, вnb)	Фен-Субс (2 мг/кг, вnb)
Порог болевой реакции	6,13±1,73	23,5±6,18*	11,88±4,22*
Порог агрессивной реакции	22,5±4,96	38,8±4,51*	36,5±1,29*
Порог судорожной реакции	25,5±1,93	40,13±1,29*	31,88±1,81*

Примечание: * — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

НаноФен в дозе 2 мг/кг увеличивал порог болевой реакции животных в 3,8 раз, а порог агрессивности — в 1,72 раза (табл. 2) и, таким образом, не уступал феназепаму в субстанции по антиагрессивному действию.

При изучении противосудорожного действия установлено, что феназепам в субстанции и НаноФен в 100% случаях блокировали судороги, вызванные коразолом, в то время как в контрольной группе при введении аналогичной дозы коразола у 90% крыс наблюдались тонико-клонические судороги.

После введения бемегида в дозе 10 мг/кг в сенсомоторной коре, дорзальном гиппокампе и латеральном гипоталамусе регистрировались эпилептиформные разряды высокоамплитудных острых и медленных волн, амплитудой более 200 мкВ,

длительностью от 0,3 до 2,5 сек. (рис. 2). Число разрядов за минуту составило в среднем 12,3±4,6, а длительность разрядов за минуту — 6,1±0,4. НаноФен почти полностью устранял первично-генерализованные судороги (рис. 3) и значительно увеличивал латентное время появления эпилептиформных разрядов. Число разрядов в минуту составило 1,1±0,07, т.е. в 11 раз меньше, чем в контроле, а длительность 0,45±0,07, т.е. в 13 раз меньше, чем в контроле.

Феназепам в субстанции также ослаблял эффекты бемегида: число разрядов за минуту снижалось до 3,2±0,5, а длительность до 0,5±0,08. Таким образом, можно отметить, что противосудорожная активность НаноФен была несколько выше, чем у феназепама в субстанции.

При изучении седативного эффекта под влиянием феназепама в субстанции в дозе 1 мг/кг наблюдалось существенное уменьшение, по сравнению с контролем, числа пересечённых мышами квадратов (в 7 раз), количества вертикальных стоек (в 5 раз) и количества обследованных отверстий (в 15 раз) в открытом поле, что свидетельствует о его выраженном седативном действии. НаноФен практически не вызывал снижения числа пересечённых квадратов и числа вертикальных стоек (табл. 3).

Таблица 3

Седативный эффект феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы (НаноФен), и феназепама в субстанции (Фен-Субс) в тесте «открытое поле» в опытах на мышах в дозе 1 мг/кг

Показатели поведения	Контроль (NaCl)	НаноФен (1 мг/кг, вnb)	Фен-Субс (1 мг/кг, вnb)
Горизонтальные перемещения	32,5±3,96	37,24±3,85	4,59±1,6*
Вертикальные стойки	6,29±1,78	4,24±0,63	1,24±1,25*
Обследованные отверстия	7,12±1,75	6,88±1,45	0,47±0,63*
Число болюсов	1,82±0,21	0,35±0,16*	1,24±0,45

Примечание: * — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

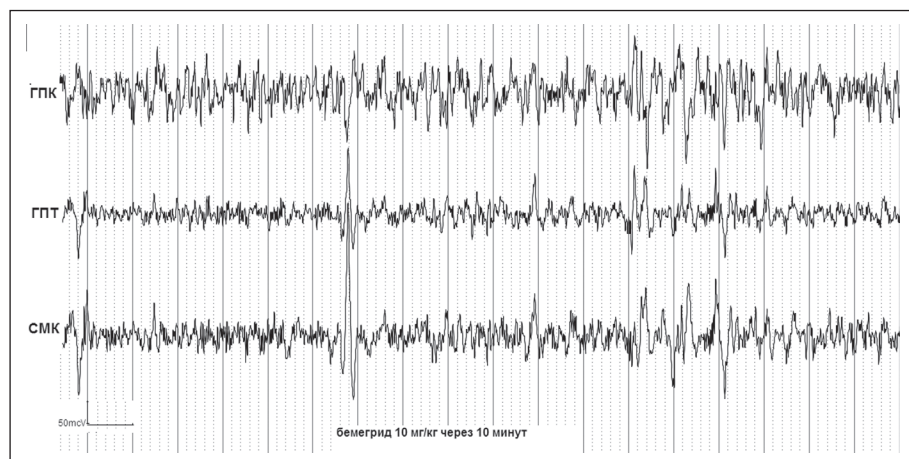


Рис. 2. Электрограммы крысы, зарегистрированные через 10 минут после введения бемеграда

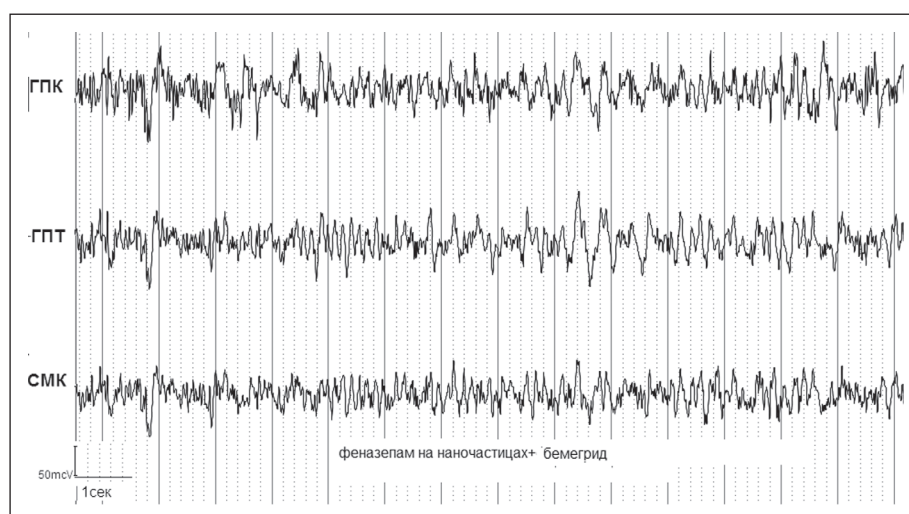


Рис. 3. Электрограммы крысы, зарегистрированные при введении НаноФен и бемеграда

Изучение миорелаксантного действия. В опытах на крысах феназепам в субстанции в дозе 1 мг/кг вызывал падение со стержня 50% крыс с латентным периодом 11,2 с., а в дозе 2 мг/кг — 80% животных с латентным периодом 4,1 с. НаноФен в дозах 1 и 2 мг/кг практически не оказывал миорелаксантного действия: количество крыс, неспособных удержаться на вращающемся стержне при использовании вещества в дозах 1 и 2 мг/кг составило 10%.

В опытах на мышах при использовании феназепама в субстанции в дозе 1 мг/кг наблюдалось падение со стержня 50% мышей с латентным периодом 8,4 с., а в дозе 2,5 мг/кг — 90% животных с латентным периодом 2,8 с. В дозе 5 мг/кг феназепам в субстанции оказывал еще более глубокое миорелаксантное действие. У животных наблюдалось расслабление задних конечностей и 50% животных не были способны перемещаться даже на плоской поверхности (лабораторном столе). НаноФен в дозе 1 мг/кг не вызывал нарушения координации движений и миорелаксантного действия. В дозе 2,5 мг/кг НаноФен вызывал нарушение коорди-

нации движений у 20% мышей при первой посадке и у 10% мышей при второй посадке. В высокой дозе 5 мг/кг НаноФен вызывал нарушение координации движений у 70% мышей.

Таким образом, полученные результаты показали, что феназепам, включенный в ПБЦА наночастицы, обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и противосудорожным действием, аналогичным действию феназепама в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции, в терапевтических дозах не обладает седативным и миорелаксантным действием.

С целью выяснения вопроса о возможном вовлечении ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса в реализацию анксиолитического действия наноразмерной формы феназепама были использованы фармакологические анализаторы — флумазенил и бикикуллин. Флумазенил — этил-8-фтор-5,6-дигидро-5-метил-6-оксо-4Н-имидазо [1,5-а-1,4] бензодиазепин-3-карбоксилат является конкурентным блокатом специфических бензодиазепиновых рецепторов

и устраняет все центральные эффекты бензодиазепиновых транквилизаторов: анксиолитический, снотворный, седативный и миорелаксантный, а также способствует восстановлению дыхания и сознания при передозировке бензодиазепинов. Бикикуллин — алкалоид, выделяемый из растения *Dicentra cucullaria*, является антагонистом ГАМК-А рецепторов и снижает центральные эффекты бензодиазепиновых анксиолитиков.

В ходе проведенного исследования установлено, что флумазенил (10 мг/кг, в/в), введенный после феназепама (1 мг/кг), достоверно снижает анксиолитический эффект как феназепама в субстанции, так и НаноФен, о чём свидетельствует значительное уменьшение (более чем в 6 раз) числа наказуемых взятий воды по сравнению с показателями одних веществ (рис. 4). Бикикуллин (1 мг/кг, в/в) также ослабляет анксиолитический эффект феназепама в субстанции и НаноФен (рис. 4), но его эффект был менее выражен, чем эффект флумазенила. Полученные данные позволяют предположить, что в реализацию анксиолитиче-

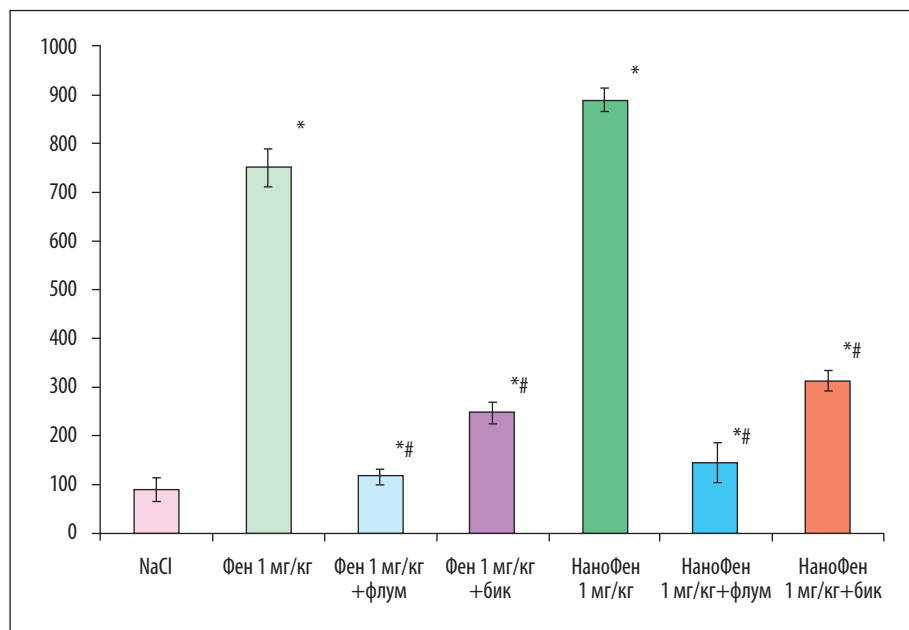


Рис. 4. Влияние флумазенила (флум) в дозе 10 мг/кг и бикукуллина (бик) в дозе 1 мг/кг на анксиолитическое действие феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы в дозе 1 мг/кг, и феназепама в субстанции в дозе 1 мг/кг, в тесте конфликтной ситуации в опытах на крысах

* — различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

— различие с препаратом без антагониста достоверно при $p < 0,05$

ского действия НаноФен также как и в механизм действия феназепама в субстанции, вовлекаются бензодиазепиновые и ГАМК-А рецепторы.

С целью получения доказательных представлений о механизме действия наноразмерной формы феназепама проводили изучение рецепторного связывания феназепама, включённого в ПБЦА НЧ с бензодиазепиновыми рецепторами мозга в условиях *in vitro* и *ex vivo*.

Эксперименты *in vitro*. Результаты сравнения динамики специфического связывания и величин IC_{50} двух серий экспериментов в условиях *in vitro* представлены на рис. 5. Как феназепам, так НаноФен вмешиваются в процесс связывания [N-метил- 3H] -флунитразепама с рецепторами гиппокампа с близкими величинами 2,8 и 6,6 нмоль/л. Полученные данные *in vitro* свидетельствуют о том, что включение феназепама в ПБЦА наночастицы не изменяет способности феназепама специфически связываться с БДЗ-рецепторами мозга.

Эксперименты *ex vivo*. Результаты изучения состояния БДЗ-рецепторов после 5-кратного системного введения феназе-

пама и НаноФен представлены на рис. 6. Эффекты обоих веществ описываются классическими кривыми насыщения, указывающими на монотонное и моноцентрическое связывание лиганда. При этом обе экспериментальные кривые лежат существенно выше, чем в контрольной группе сравнения.

Количественные параметры рецепторного связывания, рассчитанные по программе Graphpad Prism 4 Demo, приведены в табл. 4, из которой следует, что под влиянием субхронического введения изменениям подвергаются обе константы, описывающие состояние БДЗ-рецепторов: во-первых, величины констант диссоциации K_d уменьшаются в обеих группах на 22% ($p < 0.01$), что интерпретируется как возрастание степени структурного сродства рецептора к лиганду ([N-метил- 3H] -флунитразепаму); во-вторых, возрастают величины B_{max} , отражающие плотность мест связывания лиганда. Причём, под влиянием феназепама количество рецепторов увеличивается на 46% ($p < 0.01$), а под воздействием НаноФен — на 70% ($p < 0.01$). При этом действие НаноФен оказывается заметно эффективнее ($p < 0.05$).

Таблица 4

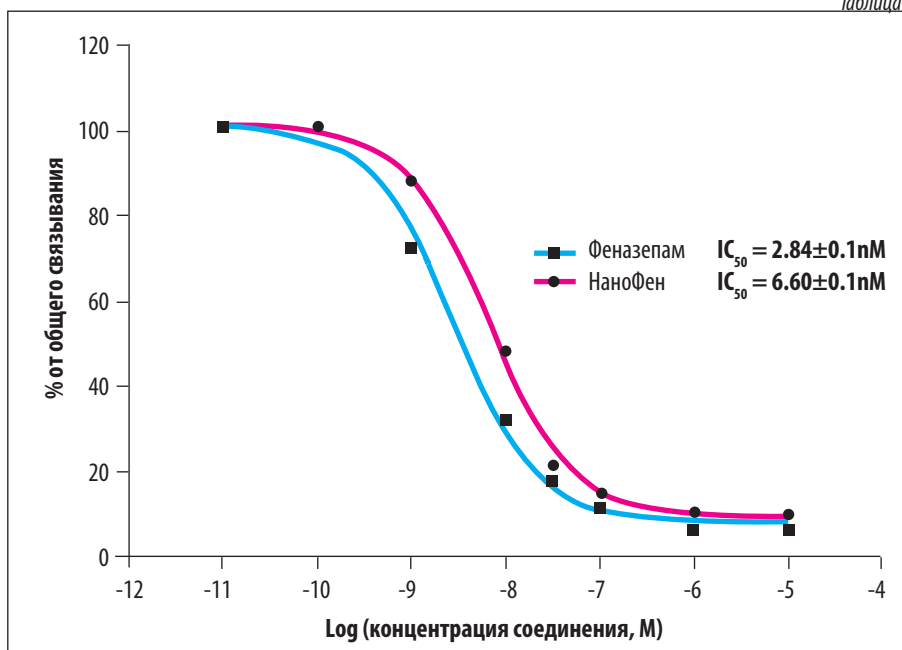


Рис. 5. Влияние феназепама и НаноФен на связывание [N-метил- 3H] -флунитразепама мембранами гиппокампа крыс *in vitro*

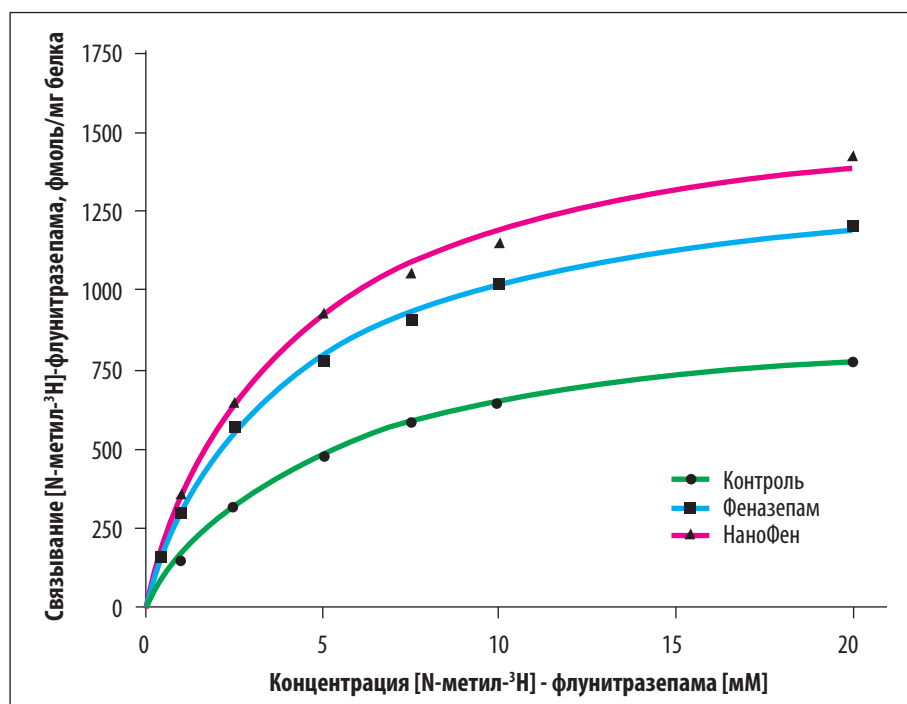


Рис. 6. Сравнительное влияние субхронического введения феназепама (1 мг/кг, 5 дней) и НаноФен (1 мг/кг, 5 дней) на характеристики радиолигандного связывания с мембранами гиппокампа крыс *ex vivo*

Характеристики рецепторного связывания феназепама и НаноФен с БДЗ-рецепторами гиппокампа крыс после субхронического введения (1 мг/кг/день*5) *ex vivo*

Группы	B_{max} , фмоль/мг белка (% к контролю)	K_d , нмоль/л (% к контролю)
Контроль	975±17 (100±2%)	5,02±0,23 (100±5%)
Феназепам	1427±28* (146±3%)	3,94±0,22* (78±4%)
НаноФен	1662±44*/** (170±5%)	3,92±0,30* (78±6%)

Примечания: * — отличие от контроля $p < 0.01$; ** — отличие от феназепама $p < 0.05$

Обсуждение результатов

При изучении спектра фармакологических эффектов феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы, было установлено, что он обладает выраженным анксиолитическим эффектом в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, аналогичным эффекту феназепама в субстанции, который является дозозависимым и усиливается при повышении дозы от 0,1 до 1,0 мг/кг. По выраженности анксиолитического эффекта феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, даже несколько превосходит феназепам в субстанции, однако, различия не носят достоверного характера. Наряду с анксиолитическим эффектом, феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, и фе-

назепам в субстанции обладают сходным антиагрессивным эффектом в тесте «драки» пары мышей на электродном полу и противосудорожным эффектом в тестах антагонизма с коразолом и бемебридом. В тоже время, феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, в сравнении с феназепамом в субстанции, не обладает в терапевтических дозах седативным и миорелаксantным действием. В высокой дозе (5 мг/кг) НаноФен оказывает значительно меньшее миорелаксantное действие (нарушение координации движений у 70% животных), чем феназепам в субстанции (нарушение координации у 100% животных, расслабление задних конечностей и неспособность передвижения даже на плоской поверхности).

Таким образом, феназепам, инкапсулированный в ПБЦА наночастицы, покрытые полисорбатом 80, в сравнении с феназепамом в субстанции, обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и противосудорожным действием, аналогичным действию феназепама в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции, в терапевтических дозах не обладает седативным и миорелаксantным действием.

Для объяснения вышеуказанных эффектов феназепама, включённого в матрикс ПБЦА, нами были проведены исследования, которые позволяют предположить, что в реализацию анксиолитического действия феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы, также как и в действие феназепама в субстанции, вовлекаются бензодиазепиновые и ГАМК-А рецепторы. Об этом свидетельствует тот факт, что флумазенил — антагонист бензодиазепиновых рецепторов достоверно снижает анксиолитическое действие феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы. Наряду с этим, достоверно снижает анксиолитическое действие феназепама бикакуллин — антагонист ГАМК-А рецепторов. Полученные данные позволяют предположить, что фармакологические эффекты инкапсулированного в наночастицы феназепама реализуются через бензодиазепиновые рецепторы, которые аллостерически связаны с ГАМК-А рецепторами.

Результаты проведённых исследований по изучению рецепторного связывания в условиях *in vitro* подтвердили предположение о том, что действие инкапсулированного в наночастицы фена-

зепам опосредуется через БДЗ-рецепторы. При этом установлено, что поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы не влияют на способность феназепама специфически связываться с БДЗ-рецепторами мозга. Выявленное в экспериментах *ex vivo* существенное возрастание константы B_{max} при субхроническом введении наноформы феназепама свидетельствует об увеличении плотности участков связывания феназепама в структуре БДЗ-рецепторов гиппокампа. Таким образом, некоторое повышение фармакологической активности феназепама, включённого в ПБЦА наночастицы, можно отчасти объяснить его более полным связыванием с БДЗ-рецепторами мозга.

К настоящему времени можно считать доказанным, что поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы, покрытые полисорбатом 80, способны осуществлять доставку ЛВ в мозг [11–16]. Ключевую роль в этом процессе играют апополипротеины Аро-Е и АроА-1, сорбирующиеся на поверхность частицы из плазмы крови [17, 18]. Наличие апополипротеинов на поверхности наночастиц придаёт им сходство с липопротеинами плазмы крови, что и обеспечивает их рецептор-зависимый эндоцитоз эндотелиоцитами капилляров мозга [19]. Внутри

эндотелиальной клетки частица подвергается биодegradации под действием ферментов и выделяет ЛВ, которое затем диффундирует через мембрану в межклеточное пространство.

В структурах мозга выявлена различная плотность рецепторов к Аро-Е и АроА-1. Показано, что в головном мозге рецепторы к АроЕ и АроА-1 находятся в наибольшем количестве в гиппокампе и коре [20–22]. Эти данные хорошо коррелируют с результатами о том, что именно в гиппокампе, а также в коре и в значительно меньшей степени в других структурах под влиянием нанокапсулированного феназепама происходит усиление спектров мощности ЭЭГ [23].

Учитывая вышеизложенное можно предположить, что феназепам, включённый в ПБЦА наночастицы, доставляется преимущественно в гиппокамп и кору, т.е. в структуры наиболее значимые для проявления анксиолитического эффекта, и в которых плотность рецепторов к АроЕ и АроА-1 максимальна. Этот факт в определённой степени объясняет наблюдаемое расслоение основных и побочных эффектов инкапсулированного в поли (бутил) цианоакрилатные наночастицы феназепама.

Литература

1. Wohlfart S., Gelperina S., Kreuter J. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles. *J. Control. Release* 2012. Vol. 161, P. 264–273.
2. Kreuter J., Gelperina S. Use of nanoparticles for cerebral cancer. *Tumori* 2008. Vol. 94, P. 271–277.
3. Andrieux K., Garcia-Garcia E., Kim H. R., Couvreur P. Colloidal carriers: a promising way to treat central nervous system diseases. *J. Nanoneurosci.* 2009. № 1. P. 17–34.
4. De Juan B. S., Von Briesen H., Gelperina S. E., Kreuter J. Cytotoxicity of doxorubicin bound to poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles in rat glioma cell lines using different assays. *J. Drug Target.* 2006. № 14. P. 614–622.
5. Aktas Y., Yemisci M., Andrieux K., et al. Development and brain delivery of chitosan-PEG nanoparticles functionalized with the monoclonal antibody OX26. *Bioconjug. Chem.* 2005. № 16. P. 1503–1511.
6. Steiniger S. C., Kreuter J., Khalansky A. S., et al. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles. *Int. J. Cancer* 2004. Vol. 109, P. 759–767.
7. Wang C. X., Huang L. S., Hou L. B., et al. Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model. *Brain Res.* 2009. Vol. 1261, P. 91–99.
8. Mahajan S. D., Roy I., Xu G., et al. Enhancing the delivery of antiretroviral drug «Saquinavir» across the blood brain barrier using nanoparticles. *Curr. HIV Res.* 2010. Vol. 8. P. 396–404.
9. Воронина Т. А., Середенин С. Б. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ. — Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р. У. Хабриева. М.: Медицина, 2005. С. 253–263.
10. Pellow S. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods.* 1982. Vol. 14. P. 149–167.
11. Alyautdin R., Gothard D., Petrov V., et al. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm* 1995. Vol. 41. P. 44–48.
12. Alyautdin R. N., Petrov V. E., Langer K., et al. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm. Res.* 1997. Vol. 14. P. 325–328.
13. Gulyaev A. E., Gelperina S. E., Skidan I. N., et al. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles. *Pharm. Res.* 1999. Vol. 16. P. 1564–1569.
14. Басел А., Петров В. Е., Балабаньян В. Ю. и др. Транспорт прозерина в головной мозг при помощи полибутилцианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом 80. *Рос. мед. журн.* 2006. № 4. С. 28–32.

15. Kurakhmaeva K. B., Djindjikhshvili I. A., Petrov V. E., et al. Brain targeting of nerve growth factor using poly (butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *J. Drug Target.* 2009. Vol. 17. P. 564–574.
16. Балабанян В. Ю., Солев И. Н., Елизарова О. С. и др. Нейропротекторный эффект человеческого рекомбинантного эритропоэтина, сорбированного на полимерных наночастицах, на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (модель геморрагического инсульта). *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2011. № 5. С. 8–13.
17. Kreuter J., Hekmatara T., Dreis S., et al. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J. Control. Release* 2007. Vol. 117, P. 54–58.
18. Zensi A., Begley D., Pontikis C., et al. Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein A-I cross the blood–brain barrier and enter the rodent brain// *J. Drug Target.* 2010. Vol. 18. P. 842–848.
19. Kreuter J., Shamenkov, D. Petrov V., et al. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood–brain barrier// *J. Drug Target.* 2002. Vol. 10. P. 317–325.
20. Holtzman D. M., Bales K. R., Tenkova T. et al. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2000. Vol. 105, P. 2892–2897
21. Irizarry M. C., Cheung B., Rebeck et al. Apolipoproteins affect the amount, form, and anatomical distribution of amyloid — peptide deposition in homozygous APP V717F transgenic mice. *Acta Neuropath.* 2000. Vol. 100, P. 451–458
22. Bales K. R., Verina T., Cummins D. J. et al. Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP V717F transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999. Vol. 96, 1523–1528
23. Разживина В. А. Изучение эффектов феназепама на поли (бутил) цианоакрилатных наночастицах. — Автореф. дисс. канд. биол. наук. М. 2009. 24 с.